

F I

(19) Federal Republic of Germany
(12) Exclusive Patent

Patent Specification
(11) DD 300 049 A7

Granted according to Section 18 paragraph 2
Patent Law of the German Democratic Republic of 27 October 1983
In agreement with the corresponding establishment in the Unification Treaty
5(51) G 10 N21/64

German Patent Office

(21) DD G 01 N/316 1041

(22) 26 May 1988

(45) 21 May 1992

(71) Humboldt University at Berlin, Directorship for Research, Unter den Linden 6, o-1086 Berlin, Germany

(72) Senoner, Mathias, Dr. rer.nat. Dipl.-Phys.; Holer, Bernard, Dr.-Ing. Dipl.-Ing; Thierbach, Uwe, Dipl.-Ing., Germany

(73) Humboldt University at Berlin, Physics Department, o-1040 Berlin, Germany

(54) Procedure for the recording and evaluation of light-induced changes of chlorophyll fluorescence

(55) Chlorophyll fluorescence; induction curve measurement; photosynthetic activity

(57) The invention concerns a procedure for the recording and evaluation of light-induced changes in chlorophyll fluorescence. The invention has as its purpose the preparation of an economical and objective procedure which allows a reproducible evaluation of the physiological state of the plant in a short time period, without the destruction of the plant material under investigation, under field conditions, by means of a single apparatus. As a solution, at this point it is intended that a cycle be conducted with defined priming illumination and a defined dark phase, followed by the recording and evaluation of the two characteristic values of the determined induction curve by means of an electronic control, and that the quotient of the two characteristic values delivers the statement concerning the physiologic state of the investigated plant. Fig. 1.

Light on

Light off

Intensity of the fluorescence

Fig. 1

ISSN 0433-6461

5 Pages

-1- 300 049

Patent Claims:

1. Procedure for the recording and evaluation of light-induced changes of chlorophyll fluorescence on the basis of electronic recording of an induction curve of chlorophyll fluorescence, recognizable in that a cycle is performed by means of an electronic control, with defined priming illumination and a defined dark phase, with the ensuing recording and evaluation of two characteristic values of the induction curve.
2. Procedure according to claim 1, recognizable in that the electronic recording and processing of the characteristic values consists of these values being stored, and the quotient of these values being calculated and displayed digitally.
3. Procedure according to claim 1, recognizable in that maximum and minimum values of the induction curve are used as electronically stored characteristic values.
4. Procedure according to claim 1, recognizable in that values of the induction curve at certain specific times after the beginning of illumination are used as electronically stored characteristic values.

2 pages of drawings are attached

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Application area of the invention

The invention concerns a procedure for the recording and evaluation of light-induced changes in the chlorophyll fluorescence of living plants, which can be used both in the framework of scientific research and also in the area of land and forest management for the characterization of the physiologic state of plants.

Characteristics of the known state of technology

The physiologic state of plants is determined by their development state, diseases, natural (heat and dryness) and anthropogenic (air pollution) stress as well as other factors. The investigation of the influence of these factors and the proof of plant damage are currently conducted primarily with biochemical methods. These methods require a chemical processing and therefore the destruction of the plant material. This is connected with the loss of valuable plant material (for example, in the propagation of new types) and does not permit the physiologic state of the plant to be followed over the course of time. For these reasons, measurement methods that avoid destruction (of which optical methods are the primary alternative to gas exchange measurements) have an increasing significance for the investigation of plants. This is especially valid for the measurement of chlorophyll fluorescence, since it is excellently suited to demonstrate damage to the photosynthesis apparatus. The measurement of light-induced changes of chlorophyll fluorescence (induction curve) is currently a widely used method in plant physiology laboratories. In this way, the induction curve is drawn and then evaluated. In order to also apply these methods in the field, a portable fluorescence meter (US-PS 4084905) was developed. In the deployment of this device, an additional device must be used next to the actual fluorescence meter for the storage of the induction curve (storage oscilloscope or x-t-writer). This is a significant disadvantage, since both devices cannot be carried by one person. Also, after the actual measurement, an additional evaluation, or at least an assessment of the induction curve, must be performed. In addition to the time for the actual measurements, the time expenditure for a measurement is primarily determined by the time period for the darkness adaptation of the leaf (5 to 10 minutes) that lies between the clamping of the leaf before the beginning of the actual measurements. Therefore, with these devices, a maximum of 10 measurements per hour can be conducted. Another method for the investigation of the physiologic state of plants is based on the measurement of flash lamp induced impulses of chlorophyll fluorescence before and after a poisoning of the plant with the herbicide DCMU (DE-PS 2938056). This measurement procedure demonstrates several disadvantages. Basically, a complete higher plant cannot be measured, but instead it must be measured with separated leaves or cut sections of leaves. In this way, plant material is destroyed with each measurement, and it is not possible to follow the course of an injury over time on one and the same leaf. Additionally, this procedure is relatively time consuming, because before the first measurement a dark phase (10 minutes, according to the device description) must be allowed, and before the second measurement a time for the entrance of the herbicide must be allowed.

Goal of the Invention

The invention is the provision of an economical and objective procedure for the recording and evaluation of light-induced changes of chlorophyll fluorescence.

-2- 300 049

Explanation of the nature of the invention

The invention primarily has the task of creating a procedure for the recording and evaluation of light-induced changes in chlorophyll fluorescence, which permits a reproducible assessment of the physiologic state of a plant under field conditions within a short cycle, without the destruction of the investigated plant material, by means of a single device.

According to the invention, the task is accomplished, in that a cycle with defined priming illumination and a defined dark phase is performed through an electronic control, with an ensuing recording and processing of two characteristic values of the induction curve. Thereby the starting point for the measurement of an

THIS PAGE BLANK (USPTO)

induction curve is not the dark adapted state of the plant, but rather, a middle state defined through priming illumination and a short dark phase is used.

Ideally, the electronic recording and processing of the characteristic values consists of these values being stored, the quotient of these values being calculated and outputted digitally. This permits significant information about the form of the induction curve to be given out by means of a single number.

In the advantageous arrangement of the invention, the maximum and minimum values of the induction curve are used as electronically-stored characteristic values.

In connection with this, it is also possible to use values of the induction curve at certain specified times after the beginning of the illumination as electronically-stored characteristic values.

Implementation Example

The invention will be further explained in an implementation example as follows. In the drawings belonging thereto are shown

Fig. 1: a representation of a typical induction curve of chlorophyll fluorescence

Fig. 2: a wiring diagram of the electronic control.

In order to create defined initial conditions for the measurement of the induction curve, the plant object to be investigated is first of all subjected to a short priming illumination of, for example, 10 seconds, followed by a dark phase of, for example, 60 seconds. The induction curve then measured differs somewhat from the induction curve normally measured after 5 to 10 minutes of dark phase, but since the form of the induction curve has no absolute meaning anyway, but rather the information about the investigated object is obtained by comparison of induction curves, the difference mentioned above plays no role. Through the introduction of priming illumination and a short dark phase, the time before the actual measurement compared to the previously customary methods is shortened by at least a factor of 5. After priming illumination and dark phase, the measurement of the induction curve succeeds during a second illumination. Thereby the chlorophyll fluorescence is converted into an electric current of proportional magnitude by a photoelectric receiver. From the time course of these currents, two characteristic values are then stored. These characteristic values are either the maximum and the minimum current or two other current values, measured at certain specific times after the beginning of the second illumination (Fig. 1). From both stored characteristic values the quotient is electronically calculated and outputted digitally. In this way, only one characteristic value is selected and indicated from the entirety of the information that is contained in the induction curve. The sense of the quotient formation consists in that only the form of the induction curve is recorded, and not its absolute magnitude, since the form of the induction curve is determined by the physiologic state of the plant, whereas the absolute magnitude of the chlorophyll fluorescence is significantly influenced by the parameters of leaf thickness and chlorophyll concentration, which, in this connection, are not of interest.

The described procedure can be conducted with the help of the following concrete realization. Proceeding from the manual operation of a control element 1, a one chip microcalculator 2 controls the procedure (Fig. 2) according to the code of the program contained in microcalculator 3. Thereby the following programmed procedure steps are performed:

By means of a light source 4 the object to be investigated 5 is subjected to a short priming illumination of, for example, 10 seconds. After a dark phase of, for example, 60 seconds, after the defined initial conditions for the measurement of the induction curve are present, during an additional illumination of the object 5, chlorophyll fluorescence is induced, registered by a light receiver 6, and is transformed into a further processed electrical signal with the help of an input amplifier 7. The single chip microcalculator 2 measures necessary characteristic values by means of a scanning holding circuit 8 and an analog-digital converter 9, calculates the final result, and presents it on a digital display. The entire apparatus is provided with electrical energy from an electricity source 11.

In summary, it is demonstrated that by data reduction and automatic measured value processing, the use of a recording device and a measurement device becomes superfluous. This simplification and the significantly reduced dark phase by the application of a priming illumination make it possible that the entire measurement process including evaluation can be conducted in less than two minutes of work power, by deployment of the procedure described above.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Light on

Light off

Intensity of fluorescence

Fig. 1

-4-

300049

Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 300 049 A7

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) G 01 N 21/64

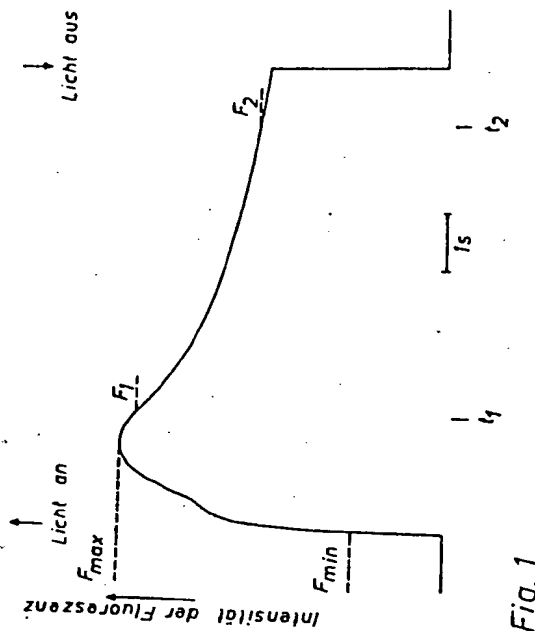
DEUTSCHES PATENTAMT

(21)	DD G 01 N / 316 104 1	(22)	26.05.88	(45)	21.05.92
(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, D - 1086 Berlin, DE				
(72)	Senoner, Mathias, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Hoier, Bernhard, Dr.-Ing. Dipl.-Ing.; Thierbach, Uwe, Dipl.-Ing., DE				
(73)	Humboldt-Universität zu Berlin, Sektion Physik, O - 1040 Berlin, DE				
(54)	Verfahren zur Erfassung und Auswertung von lichtinduzierten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz				

(55) Chlorophyllfluoreszenz; Induktionskurvenmessung;
photosynthetische Aktivität

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erfassung und Auswertung von lichtinduzierten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz. Die Erfindung bezweckt hierzu die Bereitstellung eines wirtschaftlichen und objektiven Verfahrens, welches unter Feldbedingungen ohne die Zerstörung des zu untersuchenden pflanzlichen Materials eine reproduzierbare Bewertung des physiologischen Zustandes einer Pflanze mittels eines einzigen Gerätes innerhalb einer kurzen Zeit gestattet. Als Lösung ist nunmehr vorgesehen, daß durch eine elektronische Steuerung ein Zyklus mit definierter Vorbelichtung und definierter Dunkelpause mit sich anschließender Erfassung und Verarbeitung zweier Kennwerte der ermittelten Induktionskurve durchgeführt wird und der Quotient aus den beiden Kennwerten die Aussage über den physiologischen Zustand der untersuchten Pflanze liefert.

Fig. 1



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Erfassung und Auswertung von lichtinduzierten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz auf der Grundlage elektronischer Erfassung einer Induktionskurve der Chlorophyllfluoreszenz, gekennzeichnet dadurch, daß durch eine elektronische Steuerung ein Zyklus mit definierter Vorbelichtung und definierter Dunkelpause mit sich anschließender Erfassung und Verarbeitung zweier Kennwerte der Induktionskurve durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die elektronische Erfassung und Verarbeitung der Kennwerte darin besteht, daß diese gespeichert werden, der Quotient dieser Werte berechnet und digital ausgegeben wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß als elektronisch gespeicherte Kennwerte Maximum und Minimum der Induktionskurve genutzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß als elektronisch gespeicherte Kennwerte Werte der Induktionskurve zu bestimmten festen Zeiten nach Beginn der Belichtung genutzt werden.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erfassung und Auswertung von lichtinduzierten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz lebender Pflanzen, welches sowohl im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen als auch im Bereich der Land- und Forstwirtschaft zur Charakterisierung des physiologischen Zustandes von Pflanzen genutzt werden kann.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Der physiologische Zustand von Pflanzen wird bestimmt durch ihren Entwicklungsstand, Krankheiten, natürlichen (Hitze, Trockenheit) und anthropogenen (Luftschadstoffe) Stress sowie andere Faktoren. Die Untersuchung des Einflusses dieser Faktoren und der Nachweis von Pflanzenschädigungen wird zur Zeit in erster Linie mit biochemischen Methoden durchgeführt. Diese Methoden erfordern eine chemische Aufarbeitung und damit Zerstörung des pflanzlichen Materials. Dies ist mit dem Verlust wertvollen Pflanzenmaterials verbunden (z. B. bei der Züchtung neuer Sorten) und erlaubt es nicht, den zeitlichen Verlauf des physiologischen Zustandes an einer Pflanze zu verfolgen. Aus diesem Grunde besitzen zerstörungsfreie Meßmethoden, die sind neben Messungen des C_2 -austauschs vor allem optische Methoden, eine zunehmende Bedeutung für die Untersuchung von Pflanzen. Dies gilt im besonderen für die Messung der Chlorophyllfluoreszenz, da sie hervorragend geeignet ist, Schädigungen des Photosyntheseapparates nachzuweisen. Die Messung von lichtinduzierten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz (Induktionskurve) ist heute eine weit verbreitete Methode in pflanzenphysiologischen Labors. Dabei wird die Induktionskurve aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. Um diese Methode auch unter Feldbedingungen einzusetzen, wurde ein tragbares Fluorometer (US-PS 4084905) entwickelt. Beim Einsatz dieses Gerätes muß neben dem eigentlichen Fluorometer noch ein weiteres Gerät zur Speicherung der Induktionskurve (Speicheroszilloskop oder x-t-Schreiber) eingesetzt werden. Dies ist ein wesentlicher Nachteil, da beide Geräte nicht von einer Person getragen werden können. Darüber hinaus muß nach der eigentlichen Messung noch eine Auswertung oder zumindest Bewertung der Induktionskurve vorgenommen werden. Der zeitliche Aufwand für eine Messung wird neben der eigentlichen Messung vor allem durch die zwischen dem Einspannen des Blattes und dem Beginn der Messung gelegenen Zeit für die Dunkeladaptation des Blattes (5 bis 10 Minuten) bestimmt. Daher sind mit diesem Gerät maximal 10 Messungen pro Stunde durchführbar.

Eine andere Methode zur Untersuchung des physiologischen Zustandes von Pflanzen basiert auf der Messung von blitzlampenangeregten Impulsen der Chlorophyllfluoreszenz vor und nach einer Vergiftung der Pflanze mit dem Herbizid DCMU (DE-PS 2938056). Dieses Meßverfahren weist mehrere Nachteile auf. Grundsätzlich kann nicht an ganzen höheren Pflanzen gemessen werden, sondern es muß an abgetrennten Blättern oder Stanzscheiben aus Blättern gemessen werden. Somit wird bei jeder Messung Pflanzenmaterial vernichtet und es ist nicht möglich den zeitlichen Verlauf einer Schädigung an ein und dem selben Blatt zu verfolgen. Darüber hinaus ist dieses Meßverfahren relativ zeitaufwendig, da vor der ersten Messung eine Dunkelzeit (laut Gerätebeschreibung 10 min) und vor der zweiten Messung eine Zeit für das Eindringen des Herbizids einzuhalten ist.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines wirtschaftlichen und objektiven Verfahrens zur Erfassung und Auswertung von lichtinduzierten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde ein Verfahren zur Erfassung und Auswertung von lichtinduzierten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz zu schaffen, welches unter Feldbedingungen ohne die Zerstörung des zu untersuchenden pflanzlichen Materials eine reproduzierbare Bewertung des physiologischen Zustandes einer Pflanze mittels eines einzigen Gerätes innerhalb eines kurzen Zyklus gestattet.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß durch eine elektronische Steuerung ein Zyklus mit definierter Vorbelichtung und definierter Dunkelpause mit sich anschließender Erfassung und Verarbeitung zweier Kennwerte der Induktionskurve durchgeführt wird. Hierdurch wird erstmals als Ausgangspunkt für die Messung einer Induktionskurve nicht der dunkeladaptierte Zustand der Pflanze sondern ein durch Vorbelichtung und kurze Dunkelpause definierter Zwischenzustand genutzt.

Vorteilhafterweise besteht die elektronische Erfassung und Verarbeitung der Kennwerte darin, daß diese gespeichert werden, der Quotient dieser Werte berechnet und digital ausgegeben wird. Dies gestattet eine signifikante Information über die Form der Induktionskurve mittels einer einzigen Zahl auszugeben.

In vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung werden als elektronisch gespeicherte Kennwerte Maximum und Minimum der Induktionskurve genutzt.

In diesem Zusammenhang ist es aber auch möglich, daß als elektronisch gespeicherte Kennwerte Werte der Induktionskurve zu bestimmten festen Zeiten nach Beginn der Belichtung genutzt werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend in einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden. In der zugehörigen Zeichnung zeigen

Fig. 1: eine Darstellung einer typischen Induktionskurve der Chlorophyllfluoreszenz

Fig. 2: ein Blockschaltbild der elektronischen Steuerung.

Um definierte Ausgangsbedingungen für die Messung der Induktionskurve zu schaffen wird das zu untersuchende pflanzliche Objekt zunächst einer kurzen Vorbelichtung von beispielsweise 10 Sekunden und einer anschließenden Dunkelpause von beispielsweise 60 Sekunden unterzogen. Die dann gemessene Induktionskurve unterscheidet sich etwas von der üblicherweise nach 5 bis 10 min Dunkelpause gemessenen Induktionskurve. Da aber der Form der Induktionskurve ohnehin keine absolute Bedeutung zukommt, sondern die Informationen über das untersuchte Objekt durch Vergleich von Induktionskurven gewonnen werden, spielt der oben genannte Unterschied keine Rolle. Durch die Einführung von Vorbelichtung und kurzer Dunkelpause wird die Zeit vor der eigentlichen Messung gegenüber der bisher üblichen Methode mindestens um den Faktor 5 verkürzt. Nach Vorbelichtung und Dunkelpause erfolgt während einer zweiten Belichtung die Messung der Induktionskurve. Dabei wird mit einem photoelektrischen Empfänger die Chlorophyllfluoreszenz in eine dieser Größe proportionale elektrische Spannung verwandelt. Aus dem zeitlichen Verlauf dieser Spannung werden dann zwei Kennwerte gespeichert. Diese Kennwerte sind entweder das Maximum und das Minimum der Spannung oder zwei andere, zu bestimmten festen Zeiten nach dem Beginn der zweiten Belichtung gemessene, Spannungswerte (Fig. 1). Aus den beiden gespeicherten Kennwerten wird elektronisch der Quotient berechnet und digital ausgegeben. Damit wird aus der Gesamtmenge der Informationen, die in der Induktionskurve enthalten sind, nur ein charakteristischer Wert ausgewählt und angezeigt. Der Sinn der Quotientenbildung besteht darin, daß dadurch nur die Form der Induktionskurve und nicht deren absolute Größe erfaßt wird, denn die Form der Induktionskurve wird durch den physiologischen Zustand der Pflanze bestimmt, wohingegen die absolute Größe der Chlorophyllfluoreszenz durch die in diesem Zusammenhang nicht interessierenden Parameter Blattdicke und Chlorophyllkonzentration wesentlich beeinflusst wird.

Das beschriebene Verfahren kann mit Hilfe der folgenden konkreten Realisierung durchgeführt werden. Ausgehend von der manuellen Betätigung eines Bedienelementes 1 steuert ein Einchipmikrorechner 2 nach der Vorschrift des im Mikrorechnerspeicher 3 enthaltenen Programmes das Verfahren (Fig. 2). Dabei werden folgende Verfahrensschritte programmiert abgearbeitet:

Mittels einer Lichtquelle 4 wird das zu untersuchende Objekt 5 einer kurzen Vorbelichtung von beispielsweise 10 s unterzogen. Nach einer Dunkelpause von beispielsweise 60 s, nach der definierte Ausgangsbedingungen für die Messung der Induktionskurve vorliegen, wird während einer weiteren Belichtung des Objektes 5 die Chlorophyllfluoreszenz angeregt, von einem Lichtempfänger 6 registriert und mit Hilfe eines Vorverstärkers 7 in ein weiterverarbeitbares elektrisches Signal umgeformt. Der Einchipmikrorechner 2 mißt mittels einer Abtast-Halte-Schaltung 8 und eines Analog-Digital-Umsetzers 9 die notwendigen Kennwerte, berechnet das Endergebnis und stellt es auf einer Digitalanzeige 10 dar. Die gesamte Einrichtung wird aus einer Stromversorgung 11 mit elektrischer Energie versorgt.

Zusammenfassend zeigt sich, daß durch Datenreduktion und automatische Meßwertverarbeitung die Verwendung eines Aufzeichnungsgerätes und eine der Messung folgende Auswertung überflüssig wird. Diese Vereinfachung und die durch die Anwendung einer Vorbelichtung wesentlich verkürzte Dunkelpause führen dazu, daß beim Einsatz des oben beschriebenen Verfahrens der gesamte Meßvorgang einschließlich Auswertung in weniger als zwei Minuten von einer Arbeitskraft durchgeführt werden kann.

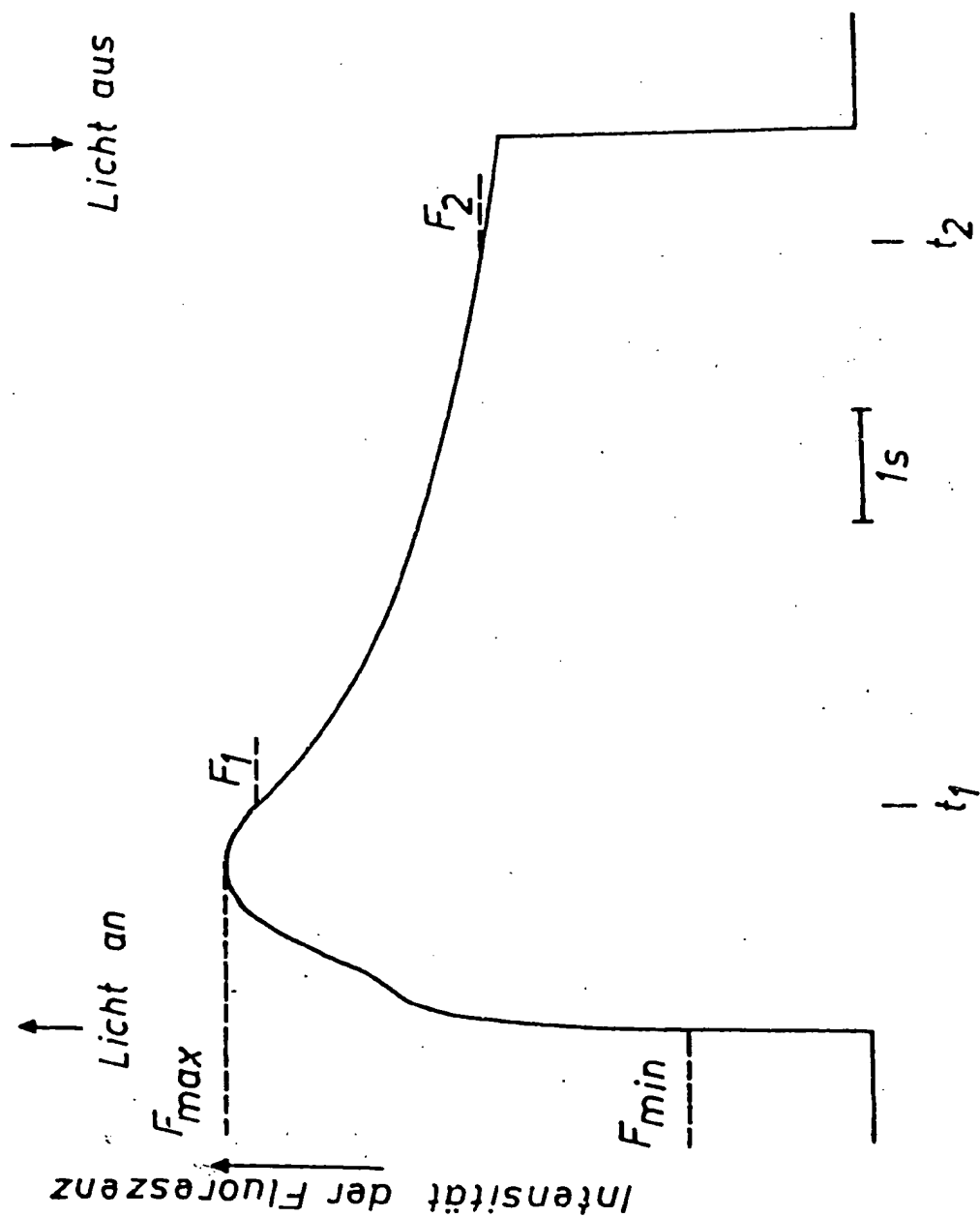


Fig. 1

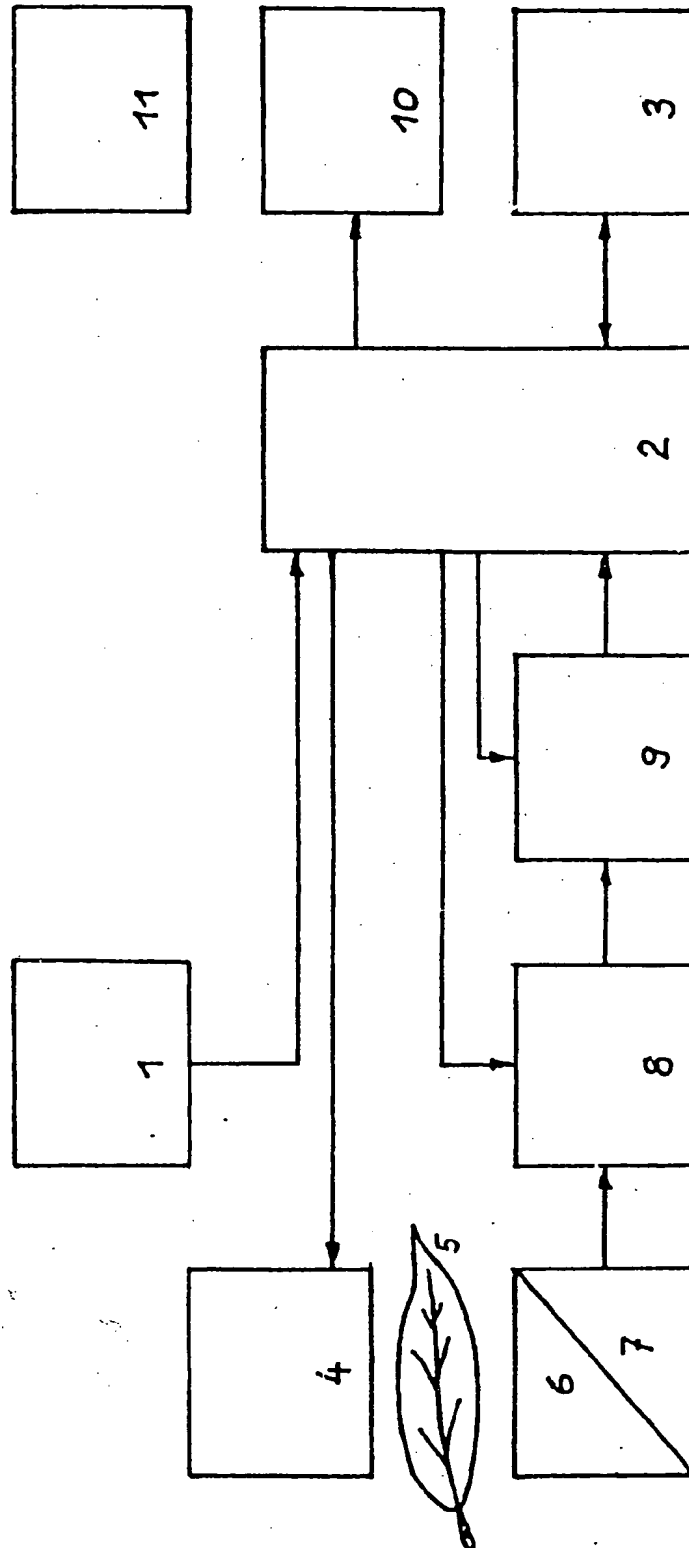


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)